

APPLICATION UNDER UNITED STATES PATENT LAWS

Atty. Dkt. No. PW 280108

(M#)

Invention: Neue für das mike17-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Inventor (s): Mike FARWICK
Klaus HUTHMACHER
Walter PFEFFERLE

Pillsbury Winthrop LLP
Intellectual Property Group
1100 New York Avenue, NW
Ninth Floor
Washington, DC 20005-3918
Attorneys
Telephone: (202) 861-3000

This is a:

- ☐ Provisional Application
- ☒ Regular Utility Application
- ☐ Continuing Application
☒ The contents of the parent are incorporated
by reference
- ☐ PCT National Phase Application
- ☐ Design Application
- ☐ Reissue Application
- ☐ Plant Application
- ☐ Substitute Specification
Sub. Spec Filed _____
in App. No. / _____
- ☐ Marked up Specification re
Sub. Spec. filed _____
In App. No. / _____

SPECIFICATION

Neue für das mikE17-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

- Gegenstand der Erfindung sind für das mikE17-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren
- 5 unter Verwendung von Bakterien, in denen das mikE17-Gen abgeschwächt wird.

Stand der Technik

- L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der
- 10 Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

- Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der
- 15 großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die
- 20 Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.
- 25 Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und die
- 30 Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-

Aminosäure produzierenden Stämmen von Corynebacterium eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

- 10 Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist/sind L-Lysin.
- 15

Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Basen, sondern auch die Salze wie z.B.

- 20 Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das mikE17-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 25 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%
- 30 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,

c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
5 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz
von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Transkriptionsregulators MikE17 aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine
10 replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No.1, oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
- 15 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

20 Weitere Gegenstände sind:

ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID No.1 dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid
25 kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;

ein Vektor, enthaltend Teile des erfindungsgemäßen Polynukleotids, mindestens aber 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der beanspruchten Sequenz,

und coryneforme Bakterien, in denen das mikE17-Gen, insbesondere durch eine Insertion oder Deletion, abgeschwächt ist.

- Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im
- 5 wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums, die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen
- 10 Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon , enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

- Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind als Hybridisierungssonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise
- 15 Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für den Transkriptionsregulator Mike17 kodieren, oder um solche Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des mikE17-Gens aufweisen.
- 20 Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für den Transkriptionsregulator Mike17 kodieren.
- 25 Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.
- 30 „Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es

sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

- Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus
- 5 hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragments.
- 10 Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.
- Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der
- 15 biologischen Aktivität des Transkriptionsregulators MikE17 und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.
- 20 Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin,
- 25 L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das mikE17-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet oder auf niedrigem Niveau exprimiert werden.
- 30 Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die

- entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder
- 5 Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

- Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder
- 10 aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist,
- 15 L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

- Corynebacterium glutamicum* ATCC13032
- 20 *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870
Corynebacterium melassecola ATCC17965
Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
Brevibacterium flavum ATCC14067
- 25 *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten beziehungsweise Stämme.

- Das neue, für den Transkriptionsregulator MikE17
- 30 kodierende mikE17-Gen von *C. glutamicum* wurde isoliert.

Zur Isolierung des mikE17-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt. Das

- Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde.
- 10 Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im E. coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 15 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.
- Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032 unter Verwendung des Cosmides pHc79 (Hohn und Collins, 1980, Gene 11, 291-298).
- 20 Zur Herstellung einer Genbank von C. glutamicum in E. coli können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, 1979, Life Sciences, 25, 807-818) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche E. coli-Stämme, die restriktions- und
- 25 rekombinationsdefekt sind wie beispielsweise der Stamm DH5 α mc α r, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden oder anderen λ -Vektoren klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend
- 30 wiederum in gängige für die DNA-Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z. B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232 (1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Die neue für das mikE17-Gen kodierende DNA-Sequenz von C. glutamicum wurde gefunden, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des mikE17-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

- Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im
- 10 Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). Die Hybridisierung findet unter stringenten
- 15 Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch
- 20 Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriffen durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited,
- 25 Teddington, UK, 1996).

- Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70%
- 30 Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's
- 35 Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim,

Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der

- 5 Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50°C auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur
- 10 Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

- 15 Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).
- 20 Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Abschwächung des mikE17-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren produzieren.

- Zur Erzielung einer Abschwächung können entweder die Expression des mikE17-Gens oder die regulatorischen
- 25 Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt oder ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

- Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung oder durch genetische Veränderung (Mutation)
- 30 der Signalstrukturen der Genexpression erfolgen. Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann z.B. in

- der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei Voskuil und Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998)), bei Pátek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)), Vasicova et al. (Journal of Bacteriology 181: 6188 (1999)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).

- Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762 (1997)) und Möckel („Die Threonindehydratase aus Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms“, Berichte des Forschungszentrums Jülichs, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

- Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinmmutationen („missense mutations“) oder Nichtsinmmutationen („nonsense mutations“) gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar (bp) in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen („frame shift mutations“), in

deren Folge falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung 5 derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und 10 Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Eine gebräuchliche Methode, Gene von *C. glutamicum* zu mutieren, ist die von Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 15 9, 84-87 (1991)) beschriebene Methode der Gen-Unterbrechung („gene disruption“) und des Gen-Austauschs („gene replacement“).

Bei der Methode der Gen-Unterbrechung wird ein zentraler Teil der Kodierregion des interessierenden Gens in einen 20 Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pK18mobsacB oder 25 pK19mobsacB (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174: 5462-65 (1992)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-Patent 5,487,993), pCR@Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., 30 Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) oder pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zentrale Teil der Kodierregion des Gens enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den 35 gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode

- der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross-over"-Ereignisses wird die Kodierregion des betreffenden Gens durch die Vektorsequenz unterbrochen und man erhält zwei unvollständige Allele, denen jeweils das 3'- bzw. das 5'-Ende fehlt. Diese Methode wurde beispielsweise von Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)) zur Ausschaltung des recA-Gens von C. glutamicum verwendet.

- Bei der Methode des Genaustausches („gene replacement“) wird eine Mutation wie z.B. eine Deletion, Insertion oder Basenaustausch in dem interessierenden Gen in-vitro hergestellt. Das hergestellte Allel wird wiederum in einen für C. glutamicum nicht replikativen Vektor kloniert und dieser anschließend durch Transformation oder Konjugation in den gewünschten Wirt von C. glutamicum überführt. Nach homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration bewirkenden "cross-over"-Ereignisses und eines geeigneten zweiten, eine Exzision bewirkenden "cross-over"-Ereignisses im Zielgen bzw. in der Zielsequenz erreicht man den Einbau der Mutation bzw. des Allels. Diese Methode wurde beispielsweise von Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998)) verwendet, um das pyc-Gen von C. glutamicum durch eine Deletion auszuschalten.

In das mikE17-Gen kann auf diese Weise eine Deletion, Insertion oder ein Basenaustausch eingebaut werden.

- Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des mikE17-Gens eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen

Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphat-Zyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

- 5 Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen oder
- 10 Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym (Protein) mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

- So kann für die Herstellung von L-Aminosäuren neben der
- 15 Abschwächung des mikE17-Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen *dapA* (EP-B 0 197 335),
- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen *gap* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 20 • das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen *tpi* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen *pgk* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 25 • das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen *zwf* (JP-A-09224661),
- das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen *pyc* (DE-A-198 31 609),

- das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mgo (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)),
- das für eine feed-back resistente Aspartatkinase
15 kodierende Gen lysC (Accession No.P26512; EP-B-0387527; EP-A-0699759; WO 00/63388),
- das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE (DE-A-195 48 222),
- das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom
10 (EP-A 0131171),
- das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen ilvA (Möckel et al., Journal of Bacteriology (1992) 8065-8072)) oder das für eine "feed back resistente" Threonin-Dehydratase kodierende Allel ilvA(Fbr) (Möckel et al.,
15 (1994) Molecular Microbiology 13: 833-842),
- das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierenden Gen ilvBN (EP-B 0356739),
- das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen ilvD (Sahm und Eggeling (1999) Applied and Environmental
20 Microbiology 65: 1973-1979),
- das für das Zwal-Protein kodierende Gen zwal (DE: 19959328.0, DSM 13115)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

- Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren
25 vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des mikE17-Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1, DSM 13047),
 - das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478, DSM 12969),
- 5 • das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (DE:1995 1975.7, DSM 13114),
- das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2 (DE: 19959327.2, DSM 13113)

- abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern, gegebenenfalls abzuschwächen.
- 10

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des mikEl7-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms“, in: 15 Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

- Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder 20 repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel 25 (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.
- 30 Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im

Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“, der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

- Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie
- 5 z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette, wie zum Beispiel Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren, wie zum Beispiel Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie zum Beispiel Glycerin und
- 10 Ethanol und organische Säuren, wie zum Beispiel Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.
- Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt,
- 15 Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.
- 20 Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie zum Beispiel Magnesiumsulfat oder
- 25 Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten
- 30 Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak

- beziehungsweise Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel, wie zum Beispiel Fettsäurepolyglykolester
- 5 eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, wie zum Beispiel Antibiotika hinzugefügt werden. Um
- 10 aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff-haltige Gasmischungen, wie zum Beispiel Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis
- 15 160 Stunden erreicht.

- Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Anionenaustausch-Chromatographie
- 20 mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

- Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen
- 25 Herstellung von Aminosäuren.

Folgender Mikroorganismus wurde am 06.03.2001 als Reinkultur bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt:

- 30 • Escherichia coli top10/pCR2.1mikE17int als DSM 14143.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von *Escherichia coli* sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *C. glutamicum* ATCC 13032

Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al., (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben, isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten.

- Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no.27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

- Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Res. 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Beispiel 2

- 20 Isolierung und Sequenzierung des Gens mikE17

- Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol. Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 μ g/ml Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academies of Sciences, U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die

Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurden mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

- 5 Weitere Analysen wurden mit den "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research, 25:33893402) gegen die non-redundant Datenbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, MD, USA) durchgeführt.
- 10 Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 1425 bp, welches als mikE17-Gen bezeichnet wurde. Das mikE17-Gen kodiert für ein Polypeptid von 474 Aminosäuren.

15 Beispiel 3

Herstellung eines Integrationsvektors für die Integrationsmutagenese des mikE17-Gens

Aus dem Stamm ATCC 13032 wurde nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994))

- 20 chromosomale DNA isoliert. Aufgrund der aus Beispiel 2 für *C. glutamicum* bekannten Sequenz des mikE17-Gens wurden die folgenden Oligonukleotide für die Polymerase Kettenreaktion ausgewählt (siehe SEQ ID No. 3 und SEQ ID No.4):

mikE17-int1:

- 25 5` AAT GGA TCA CGA TGT CAC C 3`

mikE17-int2:

5` TAG TGG GTG AAG TGG AAG C 3`

Die dargestellten Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und nach der

- 30 Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) mit der Taq-Polymerase der Firma Boehringer Mannheim (Deutschland, Produktbeschreibung Taq DNA Polymerase,

- Product No. 1 146 165) die PCR Reaktion durchgeführt. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ermöglichen die Primer die Amplifikation eines 477 bp großen internen Fragmentes des mikE17-Gens. Das so amplifizierte Produkt wurde in
- 5 einem 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch geprüft.

Das amplifizierte DNA Fragment wurde mit dem TOPO TA Cloning Kit der Firma Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA; Katalog Nummer K4500-01) in den Vektor pCR2.1-TOPO (Mead et al. (1991) Bio/Technology 9:657-663) ligiert.

- 10 Anschließend wurde der E. coli Stamm TOP10 mit dem Ligationsansatz (Hanahan, In: DNA cloning. A practical approach. Vol.I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA, 1985) elektroporiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des
- 15 Transformationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), der mit 50 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante mit Hilfe des
- 20 QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert und durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoRI und anschließender Agarosegel-Elektrophorese (0,8%) überprüft. Das Plasmid wurde pCR2.1mikE17int genannt und ist in Figur 1 dargestellt.
- 25 Folgender Mikroorganismus wurde als Reinkultur am 06.03.2001 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapestener Vertrag hinterlegt:
- Escherichia coli Top10/pCR2.1mikE17int als DSM 14143.

Beispiel 4

Integrationsmutagenese des mikE17-Gens in dem Stamm DSM 5715

Der in Beispiel 3 genannte Vektor pCR2.1mikE17int wurde
5 nach der Elektroporationsmethode von Tauch et.al.(FEMS
Microbiological Letters, 123:343-347 (1994)) in
Corynebacterium glutamicum DSM 5715 elektroporiert. Bei dem
Stamm DSM 5715 handelt es sich um einen AEC resistenten
Lysin-Produzenten (EP-A-435 132). Der Vektor
10 pCR2.1mikE17int kann in DSM5715 nicht selbständig
replizieren und bleibt nur dann in der Zelle erhalten, wenn
er ins Chromosom von DSM 5715 integriert hat. Die Selektion
von Klonen mit ins Chromosom integriertem pCR2.1mikE17int
erfolgte durch Ausplattieren des Elektroporationsansatzes
15 auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular cloning: a
laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory
Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), der mit 15 mg/l Kanamycin
supplementiert worden war.

Für den Nachweis der Integration wurde das mikE17int-
20 Fragment nach der Methode "The DIG System Users Guide for
Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH
(Mannheim, Deutschland, 1993) mit dem Dig-
Hybridisierungskit der Firma Boehringer markiert.
Chromosomale DNA eines potentiellen Integranten wurde nach
25 der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 -
1828 (1994)) isoliert und jeweils mit den
Restriktionsenzymen SalI, EcoRI und PstI geschnitten. Die
entstehenden Fragmente wurden mittels der Agarosegel-
Elektrophorese aufgetrennt und mit dem Dig-Hybridisierungskit
30 der Firma Boehringer bei 68°C hybridisiert. Das in Beispiel
3 genannte Plasmid pCR2.1mikE17int hatte innerhalb des
chromosomalen mikE17-Gens ins Chromosom von DSM5715
inseriert. Der Stamm wurde als DSM5715::pCR2.1mikE17int
bezeichnet.

Beispiel 5

Herstellung von Lysin

- Der in Beispiel 4 erhaltene *C. glutamicum* Stamm DSM5715::pCR2.1mikE17int wurde in einem zur Produktion von Lysin geeigneten Nährmedium kultiviert und der Lysingehalt im Kulturüberstand bestimmt.

- Dazu wurde der Stamm zunächst auf Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz Agar mit Kanamycin (25 mg/l) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII verwendet.

Medium Cg III

NaCl	2,5 g/l
Bacto-Pepton	10 g/l
Bacto-Yeast-Extrakt	10 g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	2% (w/v)

Der pH-Wert wurde auf pH 7.4 eingestellt

- Diesem wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur wurde 16 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft, so daß die Anfangs-OD (660 nm) der Hauptkultur 0,1 OD betrug. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM verwendet

Medium MM

CSL (Corn Steep Liquor)	5 g/l
MOPS (Morpholinopropansulfonsäure)	20 g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	50g/l
Salze:	
(NH ₄) ₂ SO ₄)	25 g/l
KH ₂ PO ₄	0,1 g/l
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1,0 g/l
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	10 mg/l
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	10 mg/l
MnSO ₄ * H ₂ O	5,0mg/l
Biotin (sterilfiltriert)	0,3 mg/l
Thiamin * HCl (sterilfiltriert)	0,2 mg/l
Leucin (sterilfiltriert)	0,1 g/l
CaCO ₃	25 g/l

- CSL, MOPS und die Salzlösung werden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend werden die sterilen Substrat- und Vitaminlösungen zugesetzt, sowie das
- 5 trocken autoklavierte CaCO₃ zugesetzt.

Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und 80% Luftfeuchtigkeit.

- 10 Nach 72 Stunden wurde die OD bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH,

München) ermittelt. Die gebildete Lysinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion
5 bestimmt.

In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	OD(660)	Lysin-HCl g/l
DSM5715	7,4	13,05
DSM5715::pCR2.1mike17int	7,6	15,14

Folgende Figur ist beigelegt:

Figur 1: Karte des Plasmids pCR2.1mikE17int.

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung.

KmR:	Kanamycin Resistenz-Gen
EcoRI:	Schnittstelle des Restriktionsenzymys EcoRI
PstI:	Schnittstelle des Restriktionsenzymys PstI
SalI:	Schnittstelle des Restriktionsenzymys SalI
mikE17int:	internes Fragment des mikE17-Gens
ColE1:	Replikationsursprung des Plasmides ColE1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa AG

5 <120> Neue für das mikE17-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> 000561 BT

<140>

10 <141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 1890

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

20

<220>

<221> CDS

<222> (252)..(1673)

<223> mikE17-Gen

25

<400> 1

aaccgccgttt ggtatcaacc aaaaagttaa gacagcccaa ccttcgcatc cagggagcaa 60

ctttgcgcag gtgacacaat tatccaaca gttgcaccgt aggtgcctaa aaagttcccg 120

30

gggcggatgt ggcccgacca cgccggggcac ctggtggcgg cggtctgcgt cgaagaagcga 180

aatcaacaa gtttgaaca cctcagtgcc aagagtgggt aaggtgatgg tgatcacgct 240

35

atagttgcgc c atg gga aag aca tat gtg ggg tcc agg ctg cgc caa ctg 290

Met Gly Lys Thr Tyr Val Gly Ser Arg Leu Arg Gln Leu
1 5 10

40

cgc cgc gaa aga gac ctg agc cag gca tcc tta gca gca acc ctt ggc 338

Arg Arg Glu Arg Asp Leu Ser Gln Ala Ser Leu Ala Ala Thr Leu Gly
15 20 25

tta tct gca agt tat gta aat cag att gag cac gac gta cgc cgc ctc 386

45

Leu Ser Ala Ser Tyr Val Asn Gln Ile Glu His Asp Val Arg Pro Leu
30 35 40 45

acc gta cgc gtg tta ttg cgc atc acc gag gcg ttc ggc gta gac gca 434

Thr Val Pro Val Leu Leu Arg Ile Thr Glu Ala Phe Gly Val Asp Ala
50 55 60

50

acg ttt ttc tcc cgc gac gat gac tcc cgc ctg ctc gcc gag gtc caa 482

Thr Phe Phe Ser Arg Asp Asp Asp Ser Arg Leu Leu Ala Glu Val Gln
65 70 75

55

gac gtc atg ctg gac cgg gag atc aat cct gcg aac gtg gag ctg caa 530

Asp Val Met Leu Asp Arg Glu Ile Asn Pro Ala Asn Val Glu Leu Gln
80 85 90

	gag ctt tcg gag atg gtg tac aac cac ccc caa cta gcg cgc gcg atg	578
	Glu Leu Ser Glu Met Val Tyr Asn His Pro Gln Leu Ala Arg Ala Met	
	95 100 105	
5	gtg gaa atg cac cag cgt tac cga aac gtg cgc gat aag ttc tcc atc	626
	Val Glu Met His Gln Arg Tyr Arg Asn Val Arg Asp Lys Phe Ser Ile	
	110 115 120 125	
10	gca gtg gat aat cgc acc aac acg cct gag gaa cgc cgt ccc atc gcg	674
	Ala Val Asp Asn Arg Thr Asn Thr Pro Glu Glu Arg Arg Pro Ile Ala	
	130 135 140	
15	gag gcc gtg agc atg ccg cac gaa gag gtc cgc gat ttc att tac gcc	722
	Glu Ala Val Ser Met Pro His Glu Glu Val Arg Asp Phe Ile Tyr Ala	
	145 150 155	
	cgc caa aac tac ttc gat gcc ctt gac cgc cgc gcc gaa gcc atc gcc	770
20	Arg Gln Asn Tyr Phe Asp Ala Leu Asp Arg Arg Ala Met Ile Ala	
	160 165 170	
	gcg caa ctg ggc tgg cag ccg tac gat tcc cgc gcc atg gaa gat tcg	818
	Ala Gln Leu Gly Trp Gln Pro Tyr Asp Ser Arg Ala Met Glu Asp Ser	
	175 180 185	
25	atc gcc cgc cgc ctg caa atg gat cac gat gtc acc atc acc tcc tcc	866
	Ile Ala Arg Arg Leu Gln Met Asp His Asp Val Thr Ile Thr Ser Ser	
	190 195 200 205	
30	aaa gag gaa tcc ggc acg ctg cac cac ttc gac ccc gag acg cgt ctg	914
	Lys Glu Glu Ser Gly Thr Leu His His Phe Asp Pro Glu Thr Arg Leu	
	210 215 220	
35	ctg aca atc cac gca cgc ctc aac ccc ggg caa cgc gcc ttc cgc atg	962
	Leu Thr Ile His Ala Arg Leu Asn Pro Gly Gln Arg Ala Phe Arg Met	
	225 230 235	
	gcc acc gaa ctc ggc tac cta gaa gcc aac gac ctc atc gaa ggt atc	1010
40	Ala Thr Glu Leu Gly Tyr Leu Glu Ala Asn Asp Leu Ile Glu Gly Ile	
	240 245 250	
	gtt gac gac ggc atc tgg tcc acc ccc gaa gcc cgc acc cta gcc atc	1058
	Val Asp Asp Gly Ile Trp Ser Thr Pro Glu Ala Arg Thr Leu Ala Ile	
	255 260 265	
45	cgc ggt gtg gcc tcc tac ttc gcc gcc gcc gtg atg ctg ccc tac aaa	1106
	Arg Gly Val Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Val Met Leu Pro Tyr Lys	
	270 275 280 285	
50	atc ttc cac tcc gag gcc gaa aaa tcc ggc tac gac atc gag tac cta	1154
	Ile Phe His Ser Glu Ala Glu Lys Ser Gly Tyr Asp Ile Glu Tyr Leu	
	290 295 300	
55	ggc caa ctc ttt ggc gtg gcc tat gag aca acc gcc cac cgc ttg tcc	1202
	Gly Gln Leu Phe Gly Val Gly Tyr Glu Thr Thr Ala His Arg Leu Ser	
	305 310 315	

000561 BT /, IP .

	acc	ctg	cag	cgc	ccc	aac	ctg	cgc	ggc	atc	ccc	ttt	acc	ttc	gtg	cgc	1250
	Thr	Leu	Gln	Arg	Pro	Asn	Leu	Arg	Gly	Ile	Pro	Phe	Thr	Phe	Val	Arg	
			320					325					330				
5																	
	gtc	gac	cgc	gcc	ggc	aac	atg	tcc	aaa	cgc	caa	tcc	gcc	acc	ggc	ttc	1298
	Val	Asp	Arg	Ala	Gly	Asn	Met	Ser	Lys	Arg	Gln	Ser	Ala	Thr	Gly	Phe	
			335				340					345					
10																	
	cac	ttc	acc	cac	tac	ggc	ggc	acc	tgc	ccc	ctg	tgg	aac	gtg	ttt	gaa	1346
	His	Phe	Thr	His	Tyr	Gly	Gly	Thr	Cys	Pro	Leu	Trp	Asn	Val	Phe	Glu	
						355						360				365	
15																	
	acc	ttc	acc	aac	ccc	ggc	caa	gtg	ctc	cgc	caa	ttc	gcg	caa	atg	ccc	1394
	Thr	Phe	Thr	Asn	Pro	Gly	Gln	Val	Leu	Arg	Gln	Phe	Ala	Gln	Met	Pro	
					370					375					380		
20																	
	gac	gga	cgc	aac	tac	ctg	tgg	atc	tca	cgc	acc	gtg	cga	cac	cac	gaa	1442
	Asp	Gly	Arg	Asn	Tyr	Leu	Trp	Ile	Ser	Arg	Thr	Val	Arg	His	His	Glu	
				385					390					395			
25																	
	gcc	cgc	ttc	ggc	gaa	gta	gac	aaa	atg	ttc	gcc	atc	ggc	ctg	ggc	tgc	1490
	Ala	Arg	Phe	Gly	Glu	Val	Asp	Lys	Met	Phe	Ala	Ile	Gly	Leu	Gly	Cys	
				400				405					410				
30																	
	gaa	gcg	cgc	cac	gcc	gac	cgc	act	gtg	tac	tcc	cgc	ggt	ttc	aac	ctc	1538
	Glu	Ala	Arg	His	Ala	Asp	Arg	Thr	Val	Tyr	Ser	Arg	Gly	Phe	Asn	Leu	
				415			420						425				
35																	
	cag	gac	ctc	tcc	acc	gcc	acc	ccc	atc	ggg	tcc	ggc	tgc	cga	gtg	tgc	1586
	Gln	Asp	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Pro	Ile	Gly	Ser	Gly	Cys	Arg	Val	Cys	
						435					440					445	
40																	
	acc	cgc	gag	aac	tgc	gcg	cag	cgc	gca	ttc	cca	tcc	gtc	cac	ggc	cgc	1634
	Thr	Arg	Glu	Asn	Cys	Ala	Gln	Arg	Ala	Phe	Pro	Ser	Val	His	Gly	Arg	
					450					455					460		
45																	
	atc	aac	atc	gac	gcg	cac	gaa	tcc	act	atc	gcg	ccg	tac	taagaaaaagg			1683
	Ile	Asn	Ile	Asp	Ala	His	Glu	Ser	Thr	Ile	Ala	Pro	Tyr				
				465				470									
50																	
	agcttgcttt	acgacgcacc	ctgcgggg														

	Arg	Asp	Leu	Ser	Gln	Ala	Ser	Leu	Ala	Thr	Leu	Gly	Leu	Ser	Ala	
5	Ser	Tyr	Val	Asn	Gln	Ile	Glu	His	Asp	Val	Arg	Pro	Leu	Thr	Val	Pro
	Val	Leu	Leu	Arg	Ile	Thr	Glu	Ala	Phe	Gly	Val	Asp	Ala	Thr	Phe	Phe
10	Ser	Arg	Asp	Asp	Asp	Ser	Arg	Leu	Leu	Ala	Glu	Val	Gln	Asp	Val	Met
	Leu	Asp	Arg	Glu	Ile	Asn	Pro	Ala	Asn	Val	Glu	Leu	Gln	Glu	Leu	Ser
15	Glu	Met	Val	Tyr	Asn	His	Pro	Gln	Leu	Ala	Arg	Ala	Met	Val	Glu	Met
20	His	Gln	Arg	Tyr	Arg	Asn	Val	Arg	Asp	Lys	Phe	Ser	Ile	Ala	Val	Asp
	Asn	Arg	Thr	Asn	Thr	Pro	Glu	Glu	Arg	Arg	Pro	Ile	Ala	Glu	Ala	Val
25	Ser	Met	Pro	His	Glu	Glu	Val	Arg	Asp	Phe	Ile	Tyr	Ala	Arg	Gln	Asn
	Tyr	Phe	Asp	Ala	Leu	Asp	Arg	Arg	Ala	Glu	Ala	Ile	Ala	Ala	Gln	Leu
30	Gly	Trp	Gln	Pro	Tyr	Asp	Ser	Arg	Ala	Met	Glu	Asp	Ser	Ile	Ala	Arg
35	Arg	Leu	Gln	Met	Asp	His	Asp	Val	Thr	Ile	Thr	Ser	Ser	Lys	Glu	Glu
	Ser	Gly	Thr	Leu	His	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Thr	Arg	Leu	Leu	Thr	Ile
40	His	Ala	Arg	Leu	Asn	Pro	Gly	Gln	Arg	Ala	Phe	Arg	Met	Ala	Thr	Glu
	Leu	Gly	Tyr	Leu	Glu	Ala	Asn	Asp	Leu	Ile	Glu	Gly	Ile	Val	Asp	Asp
45	Gly	Ile	Trp	Ser	Thr	Pro	Glu	Ala	Arg	Thr	Leu	Ala	Ile	Arg	Gly	Val
50	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Ala	Val	Met	Leu	Pro	Tyr	Lys	Ile	Phe	His
	Ser	Glu	Ala	Glu	Lys	Ser	Gly	Tyr	Asp	Ile	Glu	Tyr	Leu	Gly	Gln	Leu
55	Phe	Gly	Val	Gly	Tyr	Glu	Thr	Thr	Ala	His	Arg	Leu	Ser	Thr	Leu	Gln
	Arg	Pro	Asn	Leu	Arg	Gly	Ile	Pro	Phe	Thr	Phe	Val	Arg	Val	Asp	Arg

Ala Gly Asn Met Ser Lys Arg Gln Ser Ala Thr Gly Phe His Phe Thr
 340 345 350

5 His Tyr Gly Gly Thr Cys Pro Leu Trp Asn Val Phe Glu Thr Phe Thr
 355 360 365

Asn Pro Gly Gln Val Leu Arg Gln Phe Ala Gln Met Pro Asp Gly Arg
 370 375 380

10 Asn Tyr Leu Trp Ile Ser Arg Thr Val Arg His His Glu Ala Arg Phe
 385 390 395 400

Gly Glu Val Asp Lys Met Phe Ala Ile Gly Leu Gly Cys Glu Ala Arg
 405 410 415

15 His Ala Asp Arg Thr Val Tyr Ser Arg Gly Phe Asn Leu Gln Asp Leu
 420 425 430

20 Ser Thr Ala Thr Pro Ile Gly Ser Gly Cys Arg Val Cys Thr Arg Glu
 435 440 445

Asn Cys Ala Gln Arg Ala Phe Pro Ser Val His Gly Arg Ile Asn Ile
 450 455 460

25 Asp Ala His Glu Ser Thr Ile Ala Pro Tyr
 465 470

30
 <210> 3
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

35
 <220>
 <223> Primer mikE17-int1

40
 <400> 3
 aatggatcac gatgtcacc 19

45
 <210> 4
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

50
 <220>
 <223> Primer mikE17-int2

<400> 4
 tagtgggtga agtgggaagc 19

55

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien,
enthaltend eine für das mikE17-Gen kodierende
5 Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist
mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid
kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No.
2 enthält,
 - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das
eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens
70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von
SEQ ID No. 2,
 - 15 c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den
Polynukleotiden von a) oder b), und
 - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
aufeinanderfolgende Nukleotide der
Polynukleotidsequenz von a), b) oder c) ,wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des
20 Transkriptionsregulators MikE17 aufweist.
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid
eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt
rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid
25 eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die
Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
(i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

(ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder

(iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Hybridisierung unter einer Stringenz
entsprechend höchstens 2x SSC durchgeführt wird.

7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 1, die für ein Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2 dargestellte Aminosäuresequenz enthält.

8. Coryneforme Bakterien, in denen das mikE17-Gen abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet wird.

9. Vektor pCR2.1mikE17int,

9.1 dessen Restriktionskarte in Figur 1 wiedergegeben wird, und der

9.2 in dem E.coli Stamm Top10/pCR2.1mikE17int unter der Nr. 14143 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt ist.

10. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin,
dadurch gekennzeichnet,
daß man folgende Schritte durchführt:

- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man zumindest das mikE17-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen abschwächt, insbesondere ausschaltet,
- b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
- c) Isolieren der L-Aminosäure, wobei gegebenenfalls die Biomasse und/oder Bestandteile der Fermentationsbrühe in ihrer Gesamtmenge oder Anteilen im so erhaltenen Produkt verbleiben.

11. Verfahren gemäß Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.
12. Verfahren gemäß Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.
13. Verfahren gemäß Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Expression des (der) Polynukleotides (e), das (die) für das mikE17-Gen kodiert (kodieren) abschwächt, insbesondere ausschaltet.
14. Verfahren gemäß Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die regulatorischen Eigenschaften des Polypeptids (Enzymprotein) verringert, für das das Polynukleotid mikE17 kodiert.

15. Verfahren gemäß Anspruch 10,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme
Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig
5 eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 15.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase
kodierende Gen *dapA*,
- 15.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-
Dehydrogenase kodierende Gen *gap*,
- 10 15.3 das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende
Gen *tpi*,
- 15.4 das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende
Gen *pgk*,
- 15 15.5 das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
kodierende Gen *zwf*,
- 15.6 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen
pyc,
- 15.7 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase
kodierende Gen *mqo*,
- 20 15.8 das für eine feed-back resistente
Aspartatkinase kodierende Gen *lysC*,
- 15.9 das für den Lysin-Export kodierende Gen *lysE*,
- 15.10 das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende
Gen *hom*,
- 25 15.11 das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen
ilvA oder das für eine feed back resistente
Threonin-Dehydratase kodierende Allel
ilvA(Fbr),

- 15.12 das für die Acetohydroxysäure-Synthase
kodierende Gen *ilvBN*,
- 15.13 das für die Dihydroxysäuredehydratase
kodierende Gen *ilvD*,
- 5 15.14 das für das Zwal-Protein kodierende Gen *zwal*
verstärkt bzw. überexprimiert.
16. Verfahren gemäß Anspruch 10,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme
10 Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig
eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 16.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
kodierende Gen *pck*,
- 16.2 das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase
15 kodierende Gen *pgi*,
- 16.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB*
- 16.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2*
abschwächt, insbesondere ausgeschaltet.
17. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der
20 Teile des Polynukleotids gemäß Anspruch 1, mindestens
aber 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der
beanspruchten Sequenz, trägt.
18. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden
Ansprüche,
25 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man Mikroorganismen der Art *Corynebacterium*
glutamicum einsetzt.

19. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die für den Transkriptionsregulator MikE17 kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des mikE17-Gens aufweisen,
- 5 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man das Polynukleotid, enthaltend die Polynukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1, 2, 3 oder 4, als Hybridisierungssonden einsetzt.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das mikE17-Gen abgeschwächt vorliegt, und die Verwendung von Polynukleotiden, die die erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten, als Hybridisierungssonden.